7 月 July
2020, 63(7): 779 – 787
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.07.001

褐飞虱丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *Nlserpin*4 的克隆及表达模式分析

王正亮#, 朱杭锋#, 潘海波, 俞晓平*

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要:【目的】克隆和分析褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *Nlserpin*4,并探明其时空表达谱和病原真菌诱导表达模式。【方法】基于褐飞虱转录组和全基因组序列数据,利用 PCR 技术克隆得到褐飞虱 *Nlserpin*4 基因的全长 cDNA 序列;利用生物信息学手段分析其核苷酸和蛋白质序列特征;通过 qRT-PCR 技术检测其在褐飞虱不同发育时期(卵、1 –5 龄若虫和初羽化雌雄成虫)和 5 龄若虫不同组织(脂肪体、肠道、血淋巴和剩余虫体)中的时空表达谱,以及金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 注射感染褐飞虱 5 龄若虫不同时间后的诱导表达模式。【结果】克隆获得褐飞虱 *Nlserpin*4 基因全长 cDNA 序列(GenBank 登录号: MN822802),其开放阅读框长 1 227 bp,编码 408 个氨基酸,蛋白的相对分子质量和等电点分别为 45.91 kD 和 6.23。氨基酸序列分析表明,Nlserpin4 蛋白无糖基化位点,N 端包含一段由 23 个氨基酸残基组成的信号肽,C 端具有 serpin 蛋白家族典型的 RCL 区,且含有能被靶标蛋白酶识别的活性裂解位点。系统发育分析表明,Nlserpin4 与半翅目其他昆虫的 serpin 亲缘关系较近,其中与蔗黄伪毛蚜 *Sipha flava* serpin4 的亲缘关系最近。qRT-PCR 分析表明,*Nlserpin*4 基因表达具有明显的时空特异性,其在成虫中的表达量显著高于在其他龄期的,且在雄成虫中表达量最高;*Nlserpin*4 基因在褐飞虱 5 龄若虫脂肪体、肠道、血淋巴和剩余虫体中均有表达,且在剩余虫体组织中表达量最高;病原真菌金龟子绿僵菌诱导 48 h 内 *Nlserpin*4 表达量均显著下调,但随着诱导时间的增加,*Nlserpin*4 表达量呈回升趋势。【结论】褐飞虱 *Nlserpin*4 基因在褐飞虱不同发育阶段、不同组织以及病原真菌金龟子绿僵菌诱导不同时间下差异表达。研究结果为深入研究 Nlserpin4 在褐飞虱生长发育和免疫调节中的功能奠定了基础。

关键词: 褐飞虱; 金龟子绿僵菌; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 基因克隆; 时空表达; 诱导表达

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)07-0779-09

Cloning and expression profiling of the serine protease inhibitor gene *Nlserpin*4 in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

WANG Zheng-Liang#, ZHU Hang-Feng#, PAN Hai-Bo, YU Xiao-Ping* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract:【Aim】To clone and characterize the serine protease inhibitor gene *Nlserpin*4 from the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens*, and to determine its spatio-temporal expression profiles and its expression pattern induced by entomopathogenic fungi.【Methods】Based on the transcriptome and whole

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972347, 31601698); 浙江省杰出青年基金项目(LR19C140001)

作者简介: 王正亮, 男, 1984 年 3 月生, 安徽安庆人, 博士, 副教授, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: zhengliang.w0234@163.com; 朱杭锋, 男, 1995 年 1 月生, 浙江金华人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学及分子生物学, E-mail: 1254944705@qq.com

#共同第一作者 Authors with equal contribution

*通讯作者 Corresponding author, E-mail: yuxiaoping19630306@163.com

收稿日期 Received: 2019-11-27; 接受日期 Accepted: 2019-12-24

genome data of BPH, the full-length cDNA of *Nlserpin*4 from BPH was cloned by PCR, and its nucleotide and protein sequences were subsequently characterized using bioinformatics tools. The expression patterns of *Nlserpin*4 across different developmental stages (egg, 1st – 5th instar nymphs and newly emerged female and male adults), in different tissues (fat body, gut, hemolymph and carcass) of the 5th instar nymphs, and in the 5th instar nymphs at different time post injection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* were determined by qRT-PCR. 【Results】 The full-length cDNA of *Nlserpin*4 (GenBank accession no.: MN822802) was successfully cloned from BPH. The open reading frame (ORF) of *Nlserpin*4 is 1 227 bp in length, encoding 408 amino acids with the predicted molecular weight of 45.91 kD and isoelectric point (pI) of 6.23. The amino acid sequence analysis revealed that Nlserpin4 protein has no putative N-glycosylation site, but contains a predicted signal peptide consisting of 23 amino acid residues at the N-terminal region and a typical RCL region of the serpin family at the C-terminal region with an active cleavage site which can be recognized by target protease. The phylogenetic analysis showed that Nlserpin4 is closely related to the serpins of other hemipteran insects, with the highest homology with *Sipha flava* serpin4. The qRT-PCR results showed that the expression of *Nlsperpin*4 had obvious temporospatial characteristics. The expression level of *Nlsperpin*4 in adults was significantly higher than those in other developmental stages, and the highest expression level was observed in male adult. *Nlsperpin*4 was expressed in the fat body, gut, haemolymph and carcass, with the highest expression level in the carcass of the 5th instar nymphs. The expression of *Nlserpin*4 in BPH was significantly down-regulated after infection with *M. anisopliae* within 48 h post injection, but the expression level of *Nlserpin*4 was gradually increased with the increase of infection time. 【Conclusion】 The *Nlserpin*4 of BPH is differentially expressed in different developmental stages, different tissues and different time after infection with the entomopathogenic fungus *M. anisopliae*. The results of this study provide a theoretical basis for further studying the functions of Nlserpin4 in the growth, development and immune regulation of BPH.

Key words: *Nilaparvata lugens*; *Metarhizium anisopliae*; serine protease inhibitor; gene cloning; spatio-temporal expression; inducible expression

丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, serpin)是广泛存在于昆虫体内一类结构保守、功能多样的蛋白酶抑制剂超家族,参与调控虫体生长发育、激素分泌和免疫应答等诸多重要生理过程(赵丽芳等, 2016; Meekins *et al*., 2017)。Serpin 分子量大小一般在 40 ~ 50 kD,蛋白质序列 N 末端存在 serpin 的特有结构域,C 末端存在由大约 20 个氨基酸残基组成的反应中心环(reactive center loop, RCL)。Serpin 的靶蛋白酶识别切割 RCL 的活性裂解位点并与之共价结合,以不可逆的自杀性机制失活,从而阻断蛋白酶水解级联过程,抑制免疫应答反应(Huntington, 2011)。鉴于其重要的免疫调控功能,昆虫 serpin 一直备受国内外研究者关注(Ooi *et al*., 2015; 魏川川等, 2017; 朱笑婷等, 2017; Shakeel *et al*., 2019)。

在昆虫中,serpin 最初从家蚕 *Bombyx mori* 血淋巴中分离获得,之后又在烟草天蛾 *Manduca sexta* 体内被检测到,主要通过抑制丝氨酸蛋白酶级联反应,进而负调控 Toll 信号通路和酚氧化酶原激活通路,以防止过量的抗菌肽表达和过度的黑化反应对昆虫自身造成的伤害(Zhao *et al*., 2012; Li B *et al*., 2017; Li M *et al*., 2018)。目前相关研究主要集中在一些隶属双翅目和鳞翅目的模式昆虫中。如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 全基因组含有 29 个 serpin 基因,功能研究显示其中 Spn43Ac 通过参与 Toll 信号通路而调节宿主的先天性免疫反应, Spn27A 能有效抑制酚氧化酶原级联反应而调控宿主应对外来入侵物的防御响应(Levashina *et al*., 1999; Ligoxygakis *et al*., 2002)。在烟草天蛾中, serpin1J 和 serpin5 分别通过抑制宿主血淋巴蛋白酶 HP8 和 HP6 而对 Toll 信号通路进行负调控,与果蝇 Spn27A 同源的 serpin3 则可通过抑制酚氧化酶原的激活而阻断黑化反应的进程(Zhu *et al*., 2003; An *et al*., 2011)。然而,针对其他科目的昆虫,特别是

一些重要农业害虫中 serpin 的免疫调控功能研究较少，相关研究有待加强。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 隶属半翅目(Hemiptera)飞虱科(Delphacidae)，是我国水稻上的主要害虫，不仅直接吸食水稻汁液，造成枯干倒伏(即"虱烧")，而且还能传播水稻病毒病，对水稻生产造成毁灭性损失(吕进等，2013)。微生物防治是当前褐飞虱综合防控中的优选策略(陈列忠等，2006；Jin *et al*.，2011)。然而，其防效在很大程度上受到宿主昆虫自身免疫防御系统的制约，极大限制了相关微生物农药的开发及规模化应用(Lu and St Leger，2016；Qu and Wang，2018)。因此，研究褐飞虱的免疫调控机制对于开发褐飞虱生物防治技术工作具有重要理论和现实意义。本研究以褐飞虱为研究对象，对其免疫调控因子 Nlserpin4 基因进行克隆鉴定和生物学信息分析，并利用 qRT-PCR 分析该基因的时空表达谱以及病原真菌诱导表达模式，以期为深入研究褐飞虱 serpin 的生物学功能奠定基础，也为利用 serpin 基因进行褐飞虱虫害治理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫和病原真菌

供试褐飞虱种群为本实验室保存建立，于人工气候室内(温度 24 ± 1℃、相对湿度 70% ± 5%、光周期 16L∶8D)以 TN1 水稻苗饲养，维持种群。金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 菌株 Ma456 于 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)斜面上 4℃保存，25℃培养传代。

1.2　褐飞虱 RNA 提取及 cDNA 合成

取羽化 24 h 内的褐飞虱成虫 30 头，首先使用 75% 的酒精表面消毒虫体 3 次，每次 3 min，再用无菌蒸馏水清洗 5 遍。虫体后晾干置于研钵中用液氮研磨均匀。采用 Trizol 法提取褐飞虱总 RNA，并用微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-2000，美国)和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和浓度。以检测合格后的 RNA 为模板，使用 PrimeScript^{TM} 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa，日本)试剂盒参照说明书合成 cDNA，并于 −20℃保存备用。

1.3　Nlserpin4 基因克隆及测序

根据本实验室测得的褐飞虱转录组数据，结合 GenBank 中褐飞虱全基因组信息，筛选获得一条注释为褐飞虱丝氨酸蛋白酶抑制剂 serpin 的 cDNA 序列，命名为 *Nlserpin4*。使用 Primer Premier 5 设计 *Nlserpin4* 扩增引物 cS4F (5′-ATGGTGGTCTTCAAACAAATGGTTC-3′)和 cS4R(5′-TCAATTTCCAGTATATTTTCCACTG-3′)，以 1.2 节所得褐飞虱 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系：cDNA 模板 2 μL，dNTPs (10 mmol/L) 4 μL，正反向引物(10 μmol/L)各 1 μL，10 × Buffer(含 Mg^{2+}) 5 μL，Taq 酶 0.5 μL，ddH_2O 补充至 50 μL。扩增程序：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，55℃复性 30 s，72℃延伸 1.5 min，35 个循环；72℃延伸 7 min。PCR 反应完成后，用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测反应产物数量及分子量大小。目标扩增产物经割胶回收后与 pMD18-T 载体(TaKaRa，日本)连接，并转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞中。将菌液(100 μL)涂布于含氨苄的(100 μg/mL)并涂有 IPTG 及 X-gal 的 LB 琼脂板上，37℃倒置培养 24 h 后进行蓝白斑筛选，阳性转化子送上海桑尼测序有限公司测序。

1.4　Nlserpin4 基因及编码蛋白质序列分析

利用 ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder)预测 *Nlserpin4* 基因的开放阅读框，并翻译获得氨基酸序列；运用 BLASTP(http://blast..ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)比对 NCBI 蛋白质数据库进一步确认目标基因，并获得同源序列；用 SMART Server (http://smart.embl-heidelberg.de/)分析编码蛋白序列中的保守结构域；用 NetNGlyc1.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)进行糖基化位点预测；用 ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)对编码蛋白质的分子量和等电点进行分析；用 SignalP-5.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)分析信号肽序列；通用 MEGA X 软件以邻接(neighbor-joining，NJ)法构建系统进化树，经 1 000 次重复抽样检测其置信度(Kumar *et al*.，2018)。

1.5　Nlserpin4 基因时空表达特征分析

收集褐飞虱不同发育时期(卵、1 − 5 龄若虫以及羽化 24 h 的雌雄成虫)样品，其中卵 300 粒，1 − 2 龄若虫分别 50 头，3 − 4 龄若虫分别 40 头，5 龄若虫 30 头，初羽化雌雄成虫分别为 20 头。褐飞虱不同组织(血淋巴、脂肪体、肠道和剩余虫体)样品取自 5 龄若虫。随机选取 100 头褐飞虱 5 龄若虫，首先用 75% 的酒精表面消毒虫体 3 次，每次 3 min，再用无菌蒸馏水清洗 5 遍，晾干虫体。用解剖镊在体视显微镜下解剖收集脂肪体、肠道和剩余虫体。通过切胸足法收集血淋巴，收集的血淋巴置于冰浴的放有

少量苯硫脲晶体的离心管中,并加入等体积的 PBS(pH 7.4),4℃下 13 000 r/min 离心 10 min,弃上清(张艺馨, 2014)。各样品 RNA 提取和 cDNA 合成步骤同 1.2 节。根据 *Nlserpin*4 基因 cDNA 序列,设计一对定量 PCR 引物 qS4F (5′-CGTAGAACAACCACAACTG-3′)和 qS4R (5′-ATCTCTTGTCCTGCGTTAT-3′)。qRT-PCR 分析采用SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒,反应体系(20 μL): 2×SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 适量稀释的 cDNA 2 μL 和 ddH_2O 6 μL。扩增程序: 95℃预变性 30 s, 进入 40 个扩增循环(95℃变性 5 s, 60℃退火 34 s);融解曲线: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。以褐飞虱 *RPS*11 基因作为内参,正向引物 RPS11-F: 5′-ATGGCCGACATTCTTCCAGGTCC-3′;反向引物 RPS11-R: 5′-CCGATCGTGTGGCGTTGAAGGG-3′。其反应体系和程序同上。每个组织或龄期样品设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。*Nlserpin*4 基因在褐飞虱不同发育时期和不同组织中的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)计算,其中以不同发育时期和组织中的最低表达量为基数,数值设为 1。

1.6 Nlserpin4 基因的金龟子绿僵菌诱导表达模式分析

将病原真菌金龟子绿僵菌分生孢子以 0.02% Tween-80 水溶液制成 1×10^7 孢子/mL 浓度的悬液,用显微注射法接种 5 龄褐飞虱若虫,接种体积为 10 nL,接种 3 批次,每批次注射 100 头,以注射相同体积的 0.02% Tween-80 水溶液为对照。分别于 0 h(未接种), 接种后 6, 12, 24 和 48 h 后收集虫体,用 75% 的酒精表面消毒虫体 3 次,每次 3 min,再用无菌蒸馏水清洗 5 遍,晾干虫体备用。样品 RNA 提取和 cDNA 合成步骤同 1.2 节。qRT-PCR 程序和基因相对表达量计算方法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)同 1.5 节,以未注射组的表达量为基数,其值设为 1。

1.7 数据分析

利用绘图软件 Graphpad Prism 7.0 作图。利用 DPS 软件对实验数据进行分析与处理,计算平均值和标准误(Tang and Zhang, 2013)。利用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Tukey 氏 HSD (Tukey's honestly significant difference)法对 *Nlserpin*4 基因在褐飞虱不同发育时期、不同组织以及病原真菌不同诱导时间下的表达量进行比较分析,差异显著性水平为 $P<0.05$。

2 结果

2.1 *Nlserpin*4 基因的克隆鉴定及序列特征

以褐飞虱 cDNA 为模板扩增得到的产物经过测序和序列分析,结果显示: 褐飞虱 *Nlserpin*4 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号: MN822802)全长 1 227 bp,编码 408 个氨基酸,分子量大小为 45.91 kD,等电点 6.23。SMART 预测显示 Nlserpin4 氨基酸序列在第 39 – 408 位氨基酸残基之间含有一个 serpin 家族特有的保守性结构域。NetNGlyc1.0 预测表明 Nlserpin4 蛋白无糖基化位点。信号肽预测结果显示 Nlserpin4 包含一个长度为 23 个氨基酸信号肽序列(图 1)。多序列比对显示,与其他昆虫 serpin 相似,Nlserpin4 在 C 末端具有 RCL 区,其中第 367 位苯丙氨酸(Phe)和第 368 位丙氨酸(Ala)之间为预测的被靶蛋白酶特异性识别的活性裂解位点(图 2)。

2.2 Nlserpin4 蛋白的序列比对及进化树

利用 Blast 同源性搜索比对,发现 Nlserpin4 蛋白与褐飞虱全基因组中预测的 serpin-4 (GenBank 登录号: AGK40928)氨基酸序列完全一致。Nlserpin4 氨基酸序列与蔗黄伪毛蚜 *Sipha flava* serpin4(GenBank 登录号: XP_025406327)的一致性最高, 为 40.26%。其次为与温带臭虫 *Cimex lectularius* serpin4(GenBank 登录号: XP_014251604),两者氨基酸序列一致性为 39.95%。采用 MEGA6.0 软件以邻接法将 Nlserpin4 与其他 17 种昆虫的 serpin 构建系统进化树,结果显示: 包括褐飞虱 Nlserpin4 在内所有半翅目昆虫 serpin 聚为一支,并与膜翅目昆虫 serpin 互为姐妹群,与鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* serpin4 亲缘关系较远(图 3)。

2.3 *Nlserpin*4 基因时空表达特征

褐飞虱 *Nlserpin*4 基因在宿主不同发育时期和若虫不同组织部位中的表达量如图 4 所示。结果表明,*Nlserpin*4 基因在褐飞虱的卵期、若虫期和雌雄成虫中均有表达,且在成虫期表达量显著高于卵期和若虫期($P<0.05$)。雄成虫中 *Nlserpin*4 表达量最高,分别是雌成虫、卵和若虫期表达量(1 – 5 龄若虫期表达量的平均值)的 1.5, 5.0 和 6.8 倍。*Nlserpin*4 表达量在 1 – 3 龄若虫中无显著性差异($P>0.05$),此后随龄期增加而显著上升,如 4 龄和 5 龄若虫中 *Nlserpin*4 表达量较低龄若虫期表达量(1 – 3 龄若虫期表达量的平均值)分别增加了 2.1 和 3.2 倍(图

4：A）。*Nlserpin*4 基因在 5 龄若虫脂肪体、血淋巴、肠道和剩余虫体中均有表达，且在剩余虫体组织中表达量最高。此外，在血淋巴中 *Nlserpin*4 表达量显著高于肠道和脂肪体（$P < 0.05$），分别是肠道和脂肪体中表达量的 2.5 和 2.9 倍（图 4：B），但 *Nlserpin*4 表达量在 5 龄若虫肠道和脂肪体中差异不显著（$P > 0.05$）。

```
1     ATGGTGGTCTTCAAACAAATGGTTCTAGTCTTCATCCAAGTAATAATGGCGATGCCAGATGTCACTTCCCAAAACCAACTG
1      M  V  V  F  K  Q  M  V  L  V  F  I  Q  V  I  M  A  M  P  D  V  T  S  Q  N  Q  L
82    AGAGAAGTTGCTGCGGCAACTAATCATTTCGCACTTGATTTGCACAAGGTTTTGTCCAAGGAAAATGCGGGAAATATGTTT
28     R  E  V  A  A  A  T  N  H  F  A  L  D  L  H  K  V  L  S  K  E  N  A  G  N  M  F
163   TGTTCGCCGCTCAGCCTGCAAGTGGCACTTGCGATGGCTGCGGTTGGCGCCGCTGACCATTCCAAGACCTTCAATGAGATG
55     C  S  P  L  S  L  Q  V  A  L  A  M  A  A  V  G  A  A  D  H  S  K  T  F  N  E  M
244   AAAGCATTGCTGAGATTTCCCGATGACAAGTCCAAAATGCTTTCCAGCTACAGTTTGCTGTCTGATGCTCTTACCAATTCA
82     K  A  L  L  R  F  P  D  D  K  S  K  M  L  S  S  Y  S  L  L  S  D  A  L  T  N  S
325   GATGTGATGAAAATGGCAAACAGAATATACATCGACAAGAAGTTCAAAGTGAAGCCAGAATATTTGGAAACGACACAGAAG
109    D  V  M  K  M  A  N  R  I  Y  I  D  K  K  F  K  V  K  P  E  Y  L  E  T  T  Q  K
406   TATTTCAAATCTGATGCCAAGGAAGTTGACTTTGAGAAGAACGCTGATAACGCAGGACAAGAGATCAATGGCTGGGTAGAA
136    Y  E  K  S  D  A  K  E  V  D  F  E  K  N  A  D  N  A  G  Q  E  I  N  G  W  V  E
487   CAGCAGACTAACAACAAAATCAAGGGATTGATTCCCGAAGGAGCTCTAAAACCAGGTACTGTGATGGTACTTATCAATGCC
163    Q  Q  T  N  N  K  I  K  G  L  I  P  E  G  A  L  K  P  G  T  V  M  V  L  I  N  A
568   ATCCATTTCAAAGCCGACTGGAAGTATGCATTTGAAGCGAGATTAACTAAGAAGGAGAAATTCTATCTTGATGAGACCAGA
190    I  H  F  K  A  D  W  K  Y  A  F  E  A  R  L  T  K  K  E  K  F  Y  L  D  E  T  R
649   ACTGTTGATGTGGACATGATGAACATTAAGAAAGAGTACAATTTCTTCCACGATACACAGCTGAAAGCTAAATTTTTGGAG
217    T  V  D  V  D  M  M  N  I  K  K  E  Y  N  F  F  H  D  T  Q  L  K  A  K  F  L  E
730   ATGCCTTACAAGGGAGATGAGTTCAGTATGATTCTCGTGCTCCCCGACTCGAAAACCGGTCTCCCTGACTTGGAAAAGGCA
244    M  P  Y  K  G  D  E  F  S  M  I  L  V  L  P  D  S  K  T  G  L  P  D  L  E  K  A
811   ATCACCAACCAGAACTTTGATCTGACCAAGAAGATCGAAAATATCCAGAACTCTAGCCCCGTCAGCGTCATGGTTTCCATT
271    I  T  N  Q  N  F  D  L  T  K  K  I  E  N  I  Q  N  S  S  P  V  S  V  M  V  S  I
892   CCGAAATTTGAAATGGAATCAACTCATAACCTGGAAGAAACTTTAAAAGAGCTTGGTGTCGAAGAGATGTTCAGCGATAAA
298    P  K  F  E  M  E  S  T  H  N  L  E  E  T  L  K  E  L  G  V  E  E  M  F  S  D  K
973   GCGAATTTCTCGAACATCAACTCGGAAAATAACATTAAAGTTTCGAAAGTGATCCAGAAGGCCTTTGTGTCTGTCGATGAG
325    A  N  F  S  N  I  N  S  E  N  N  I  K  V  S  K  V  I  Q  K  A  F  V  S  V  D  E
1054  AAGGGAACCGAGGCTGCCGCGGCTACTGGTATCGCTATAGCCGTTTTTGCAGCCCCTCGTCCACCTCCTCTGTCCTTCGAA
352    K  G  T  E  A  A  A  A  T  G  I  A  I  A  V  F  A  A  P  R  P  P  P  L  S  F  E
1135  TTCTATGCTGACCATCCTTTTCTATGTCTGATAACGAAGAAAATGACCGCCACTAACATGATCCTATTCAGTGGAAAATAT
379    F  Y  A  D  H  P  F  L  C  L  I  T  K  K  M  T  A  T  N  M  I  L  F  S  G  K  Y
1216  ACTGGAAATTGA
406    T  G  N  *
```

图 1　褐飞虱 *Nlserpin*4 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

Fig. 1　cDNA sequence and the coded amino acid sequence of *Nlserpin*4 of *Nilaparvata lugens*

下划线部分为信号肽序列；RCL 区以阴影显示，其中活性裂解位点以黑框表示；星号为终止密码子。Signal peptide sequence is underlined. The RCL region is shaded and the active cleavage site is marked with box. Asterisk indicates the termination codon.

```
                         *:  **   *                   :   ::**
Apserpin4  XP_008178953  GTEAAAATGMQFALLSAWIPEPPS-NVDFHADHPFF
Sfserpin4  XP_025406327  GTEAAAATGLTFVVTSAVHVYPPPPEVQFVADHPFF
Nlserpin4  MN822802      GTEAAAATGIAIAVFAA--PRPPPLSFEFYADHPFL
Clserpin4  XP_014251604  GTEAAAATGIAVELFIYQLPT------TFKVDHPFI
Lhserpin4  XP 012233788  GSEAAAVTGISVRPLSSVWKPPEP--IILQVDHPFL
Oaserpin4  XP_012271558  GSEAAAATGIVIEVLS--ISIPET----FHVDRPFH
Btserpin4  ANW60718      GTEAAAATAMMMCLMS-APYPQED-PKRFIVDRPFY
Bmserpin4  NP_001037090  GTTAAGVTVAEFSNRIG---------VVRFEANRPFT
```

图 2　褐飞虱 Nlserpin4 与其他昆虫同源蛋白质序列 RCL 区多序列比对

Fig. 2　Multiple sequence alignment of the RCL region of Nlserpin4 from *Nilaparvata lugens* with those of homologous serpins from other insect species

Seripn 蛋白来源物种 Origin species of serpins：Apserpin4：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*；Sfserpin4：蔗黄伪毛蚜 *Sipha flava*；Nlserpin4：褐飞虱 *Nilaparvata lugens*；Clserpin4：温带臭虫 *Cimex lectularius*；Lhserpin4：阿根廷蚁 *Linepithema humile*；Oaserpin4：寄生树黄蜂 *Orussus abietinus*；Btserpin4：烟粉虱 *Bemisia tabaci*；Bmserpin4：家蚕 *Bombyx mori*. RCL 区预测活性裂解位点以阴影显示；星号和冒号分别代表完全保守的和大部分相似的的氨基酸。The predicted active cleavage site in the RCL region is shaded. Asterisk and colon indicate completely conserved and partially similar amino acids, respectively.

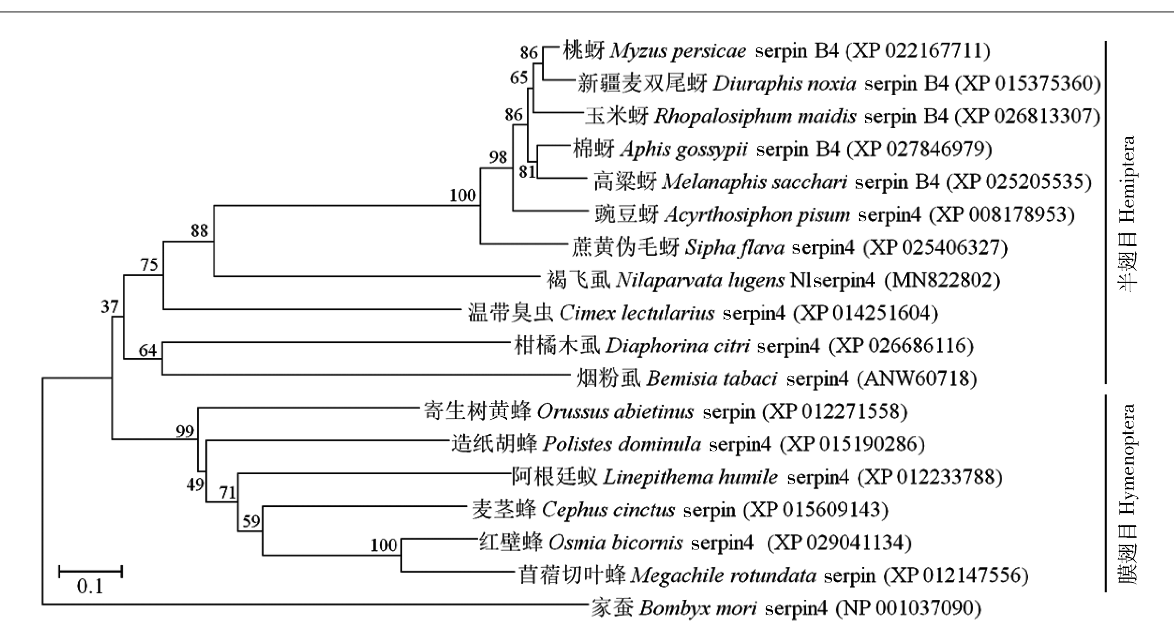


图 3 基于氨基酸序列采用邻接法构建的褐飞虱和其他昆虫 serpin 蛋白系统发育树(1 000 次重复)

Fig. 3 Phylogenetic tree of serpin proteins from *Nilaparvata lugens* and other insects based on amino acid sequences by neighbor-joining method (1 000 replicates)

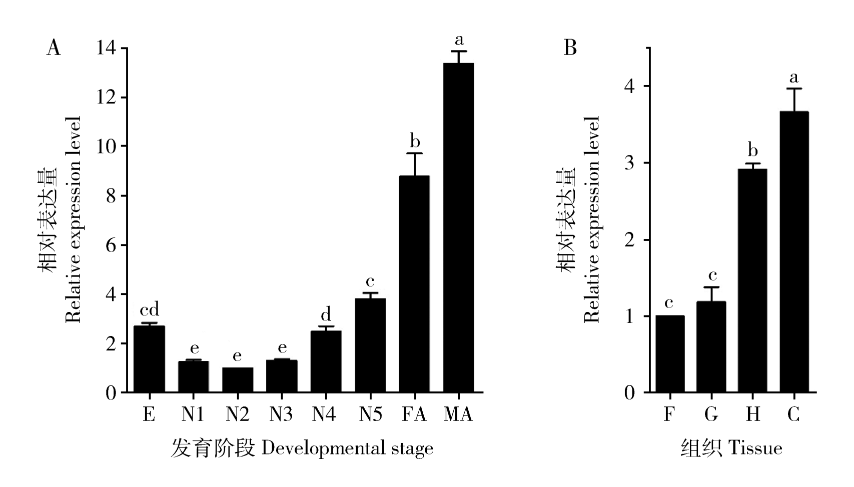


图 4 *Nlserpin*4 在褐飞虱不同发育时期(A)和 5 龄若虫不同组织(B)中的表达模式

Fig. 4 Expression profiles of *Nlserpin*4 during different developmental stages (A) and different tissues of the 5th instar nymphs (B) of *Nilaparvata lugens*

E: 卵 Egg; N1 – N5: 分别为 1 – 5 龄若虫 1st – 5th instar nymph, respectively; FA: 雌成虫 Female adult; MA: 雄成虫 Male adult; F: 脂肪体 Fat body; G: 肠道 Gut; H: 血淋巴 Hemolymph; C: 剩余虫体 Carcass. 图中数据为平均值 ± 标准误,柱上不同字母表示不同发育阶段或不同组织间基因表达量差异显著($P < 0.05$, one-way ANOVA 检验)。Data in the figure are mean ± *SE*, and different letters above bars indicate significant difference in the gene expression level among different developmental stages or tissues ($P < 0.05$, one-way ANOVA test).

2.4 金龟子绿僵菌侵染后 *Nlserpin*4 的表达模式

用金龟子绿僵菌分生孢子悬液(1×10^7 孢子/mL)显微注射接种褐飞虱 5 龄若虫,检测诱导不同时间后褐飞虱 *Nlserpin*4 的表达量,结果如图 5 所示。与对照组(注射 0.02% Tween-80 水溶液)相比,病原真菌诱导(处理组)48 h 内各时间点 *Nlserpin*4 表达量均呈显著下调($P < 0.05$);在金龟子绿僵菌刺激 6 h 后,*Nlserpin*4 表达量最低,仅为对照的 50% 水平($P < 0.05$);随着诱导时间的增加,*Nlserpin*4 表达量呈回升趋势,如诱导 24 h 和 48 h 后其表达量显著上升,分别是诱导 6 h 时的 1.4 和 1.6 倍,但与对照组相比依然是下调,且差异达到显著水平($P < 0.05$)(图 5)。

3 讨论

Serpin 是一类广泛分布于动物、植物和微生物中的蛋白酶活性调节剂,参与调节生物体内一系列

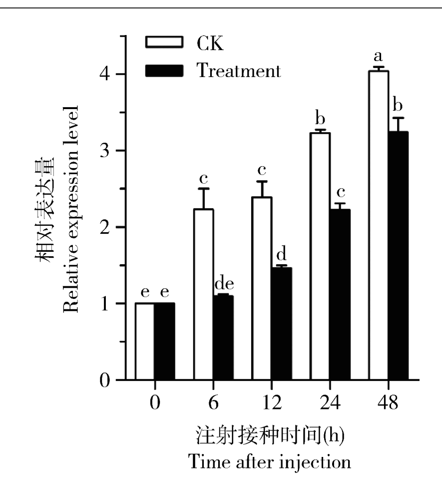


图 5 金龟子绿僵菌(1×10^7 孢子/mL 孢子悬液)侵染褐飞虱 5 龄若虫后 *Nlserpin*4 的诱导表达模式

Fig. 5 Expression pattern of *Nlserpin*4 in the 5th instar nymphs of *Nilaparvata lugens* after infection with *Metarhizium anisopliae* (1×10^7 conidia/mL spore suspension)

CK：对照组(注射 0.02% Tween-80) Control group (injected with 0.02% Tween-80)；Treatment：处理组 Treatment group. 图中数据为平均值 ± 标准误，柱上不同字母表示不同时间点间基因表达量差异显著($P<0.05$, one-way ANOVA 检验)。Data in the figure are mean ± *SE* and different letters above bars indicate significant difference in the gene expression level among different time post injection ($P<0.05$, one-way ANOVA test).

重要的生理和病理过程(Lucas *et al.*, 2018; Cohen *et al.*, 2019)。近年来，serpin 家族成员及其生物学功能已经在许多昆虫中被分离和鉴定，但相关研究主要集中于一些模式昆虫，如果蝇、蚊和家蚕(Gulley *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2018; Katsukawa *et al.*, 2018)，而对于飞虱科重要农业害虫的相关研究则相对贫乏。本研究成功从水稻重要害虫褐飞虱中克隆了 *Nlserpin*4 基因的全长 cDNA 序列，利用生物信息学手段分析了其序列特征，并通过 qRT-PCR 技术检测了其时空表达谱和病原真菌诱导表达模式。

氨基酸序列分析显示，Nlserpin4 与已鉴定的其他物种 serpin 一样，具有保守的 serpin 结构域(第 39－408位氨基酸残基)(图 1)，表明 Nlserpin4 属于 serpin 超家族成员。目前研究发现，很多昆虫 serpin 在 N 端具有信号肽序列，如在 25 个小菜蛾 *Plutella xylostella* serpin 中，11 个具有信号肽序列(Lin *et al.*, 2017)。SignalP 预测显示 Nlserpin4 在蛋白质 N 端(第 1－23 位氨基酸残基)亦存在信号肽，表明其可能是分泌型蛋白。此外，与柞蚕 *Antheraea pernyi* serpin6 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* serpin2 具有糖基化位点(曾军等, 2017; 赵雅, 2018)不同，NetNGlyc1.0 预测 Nlserpin4 氨基酸序列中不存在糖基化位点，表明其可能是非糖基化蛋白。多序列比对显示，Nlserpin4 具有 serpin 蛋白家族典型的 RCL 区，且含有能被靶标蛋白酶识别的活性裂解位点(图 2)。RCL 区作为捕获靶蛋白酶的“诱饵”，决定了 serpin 抑制活性的专一性(Huntington, 2011)。一般认为，serpin 通过其 RCL 区与靶蛋白酶以酯键共价结合后被靶蛋白酶裂解，进而引起自身构象发生转变。Serpin 构象改变继而导致靶标蛋白酶的构象变化，从而发挥蛋白酶活性抑制功能(Gettins, 2002)。由系统进化树分析结果可知，Nlserpin4 与同属半翅目昆虫的 serpin4 聚为一支，其中与蔗黄伪毛蚜和温带臭虫 serpin4 的亲源关系最近，而与鳞翅目昆虫家蚕 serpin4 亲缘关系较远(图 3)，该结果与 Blastp 比对结果一致，表明 serpin4 在半翅目昆虫中具有相对保守的进化特性，其聚类关系在一定程度上反映其亲缘关系。

*Nlserpin*4 在褐飞虱各发育阶段均有表达，成虫期表达量显著高于其他龄期，1－3 龄若虫期表达量显著低于卵期和高龄若虫期(图 4：A)，表明 *Nlserpin*4 在褐飞虱具有龄期表达特异性。Serpin 的龄期特异性表达模式同样见于其他昆虫中，如烟粉虱 serpin 在卵期和成虫期表达量最高，其他龄期表达量则较低(冯佳颖, 2016)。家蝇 *Musca domestica* serpin 基因 *SP*2 和 *SP*16 在 2 龄和 3 龄幼虫中呈普遍的高表达，而在卵期和成虫期表达量相对较低(魏川川等, 2017)。*Nlserpin*4 在褐飞虱各组织部位亦均有转录，但在不同组织部位的表达水平差异显著。定量 PCR 结果显示 *Nlserpin*4 在褐飞虱 5 龄若虫血淋巴中表达量最高，在肠道中次之，在脂肪体中的表达量较低(图 4：B)。类似的表达模式同样见于其他昆虫 serpin 的研究，如家蚕 *serpin*6 的表达量在不同组织部位从高到低排列为血淋巴 > 肠道 > 脂肪体(Li *et al.*, 2017)。然而，此表达模式与烟草天蛾 *serpin*4 基因不同，烟草天蛾 *serpin*4 在脂肪体中的表达水平明显高于其在血淋巴中的表达水平(Tong and Kanost, 2005)。可见，褐飞虱 *Nlserpin*4 的表达特征具有明显时空特异性，这表明其在褐飞虱生长发育过程中可能发挥重要调控作用。

诸多研究表明，昆虫 serpin 主要通过抑制丝氨酸蛋白酶的活性来负调控酚氧化酶原激活系统和其他有关防御通路(如 Toll 通路)的蛋白酶水解级联反应，从而抑制病原微生物诱导下过度的免疫防御反应对昆虫自身造成伤害(Yuan *et al.*, 2017; Wang

et al., 2019)。目前关于 serpin 在昆虫-病原微生物互作过程中的表达调控研究主要以“昆虫-病原细菌”为研究模型。如烟草天蛾受大肠杆菌 *Escherichia coli* 刺激后,幼虫血淋巴中 *serpin*4 的表达量显著上升,其表达产物可抑制丝氨酸蛋白酶的级联反应,从而阻断黑色素的合成(Tong and Kanost, 2005)。昆虫病原真菌以其体壁接触侵染致死模式在防治刺吸式口器害虫方面具有独特的优势(Lacey *et al*., 2015)。解析刺吸式口器害虫与病原真菌之间免疫防御与免疫逃避的“攻防”关系对于开发基于病原真菌的褐飞虱生物防治新技术具有重要的理论和现实意义。本研究检测了 *Nlserpin*4 在褐飞虱注射接种病原真菌后的诱导表达模式(图 5),结果显示金龟子绿僵菌处理褐飞虱初期(6 h) *Nlserpin*4 基因表达量显著下调,表明褐飞虱免疫防御反应可能被注射进入宿主血淋巴的病原真菌显著激活;随接种时间的延长 *Nlserpin*4 基因表达量呈现回升趋势,这可能是为了缓解由病原真菌诱导的免疫防御反应的持续激活。由此可见,Nlserpin4 在褐飞虱免疫防御病原真菌过程中扮演重要调控分子的角色,但其是如何调控宿主信号转导途径以及免疫应答反应的,暂不清楚,还有待于进一步研究。

参考文献(References)

An C, Ragan EJ, Kanost MR, 2011. Serpin-1 splicing isoform J inhibits the proSpätzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol*., 35(1): 135–141.

Chen LZ, Yu XP, Chen JM, Lu ZX, Zheng XS, Zhang JF, 2006. Advance in research on the application of symbiotes in the management of the brown planthoppers, *Nilaparvata lugens* Stål. *Agrochemicals*, 45(11): 726–729. [陈列忠, 俞晓平, 陈建明, 吕仲贤, 郑许松, 张珏锋, 2006. 共生菌在褐飞虱防治中的应用. 农药, 45(11): 726–729]

Cohen M, Davydov O, Fluhr R, 2019. Plant serpin protease inhibitors: specificity and duality of function. *J. Exp. Bot*., 70(7): 2077–2085.

Feng JY, 2016. The Cloning, Prokaryotic Expression and Temporal Expression Pattern of Serine Proteinase Inhibitor from *Bemisia tabaci*. MSc Thesis, South China Agricultural University, Guangzhou. [冯佳颖, 2016. 烟粉虱丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin 的克隆、原核表达及表达分析. 广州: 华南农业大学硕士学位论文]

Gao Q, Yang L, Dai J, Yuan G, Wang L, Qian C, Zhu B, Liu C, Wei G, 2018. Characterization and functional analysis of serpin-28 gene from silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol*., 159: 18–27.

Gettins PG, 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev*., 102(12): 4751–804.

Gulley MM, Zhang X, Michel K, 2013. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. *J. Insect Physiol*., 59(2): 138–147.

Huntington JA, 2011. Serpin structure, function and dysfunction. *J. Thromb. Haemost*., 9(Suppl. 1): 26–34.

Jin SF, Feng MG, Ying SH, Mu WJ, Chen JQ, 2011. Evaluation of alternative rice planthopper control by the combined action of oil-formulated *Metarhizium anisopliae* and low-rate buprofezin. *Pest Manag. Sci*., 67(1): 36–43.

Katsukawa M, Ohsawa S, Zhang L, Yan Y, Igaki T, 2018. Serpin facilitates tumor-suppressive cell competition by blocking Toll-mediated Yki activation in *Drosophila*. *Curr. Biol*., 28(11): 1756–1767.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol*., 35(6): 1547–1549.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS, 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol*., 132: 1–41.

Levashina EA, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, Reichhart JM, 1999. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*, 285(5435): 1917–1919.

Li B, Yu HZ, Ye CJ, Ma Y, Li X, Fan T, Chen FS, Xu JP, 2017. *Bombyx mori* Serpin6 regulates prophenoloxidase activity and the expression of antimicrobial proteins. *Gene*, 610: 64–70.

Li M, Christen JM, Dittmer NT, Cao X, Zhang X, Jiang H, Kanost MR, 2018. The *Manduca sexta* serpinome: analysis of serpin genes and proteins in the tobacco hornworm. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 102: 21–30.

Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, Jiang H, Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO J*., 21(23): 6330–6337.

Lin H, Lin X, Zhu J, Yu XQ, Xia X, Yao F, Yang G, You M, 2017. Characterization and expression profiling of serine protease inhibitors in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *BMC Genomics*, 18(1): 162.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Lu HL, St Leger RJ, 2016. Insect immunity to entomopathogenic fungi. *Adv. Genet*., 94: 251–285.

Lucas A, Yaron JR, Zhang L, Ambadapadi S, 2018. Overview of serpins and their roles in biological systems. *Methods Mol. Biol*., 1826: 1–7.

Lv J, Zhu ZR, Lou YG, Cheng JA, 2013. Review of research into outbreaks and management of rice planthoppers. *Chin. J. Appl. Entomol*., 50(3): 565–574. [吕进, 祝增荣, 娄永根, 程家安, 2013. 稻飞虱灾变和治理研究透析. 应用昆虫学报, 50(3): 565–574]

Meekins DA, Kanost MR, Michel K, 2017. Serpins in arthropod biology. *Semin. Cell Dev. Biol*., 62: 105–119.

Ooi CP, Haines LR, Southern DM, Lehane MJ, Acosta-Serrano A, 2015. Tsetse GmmSRPN10 has anti-complement activity and is important for successful establishment of trypanosome infections in the fly midgut. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9(1): e3448.

Qu S, Wang S, 2018. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 83: 96 – 103.

Shakeel M, Xu X, De Mandal S, Jin F, 2019. Role of serine protease inhibitors in insect-host-pathogen interactions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 102(3): e21556.

Tang QY, Zhang CX, 2013. Data processing system (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci.*, 20(2): 254 – 260.

Tong Y, Kanost MR, 2005. *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 280(15): 14923 – 14931.

Wang Y, Yang F, Cao X, Huang R, Paskewitz S, Hartson SD, Kanost MR, Jiang H, 2019. Inhibition of immune pathway-initiating hemolymph protease-14 by *Manduca sexta* serpin-12, a conserved mechanism for the regulation of melanization and Toll activation in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 116: 103261.

Wei CC, Xiu JF, Hu Y, Shang XL, Zhang YC, Wu JW, 2017. Cloning, sequence analysis and expression pattern of three serine protease inhibitor (*Serpin*) in *Musca domestica*. *J. Environ. Entomol.*, 39(6): 1334 – 1341. [魏川川, 修江帆, 胡亚, 尚小丽, 张迎春, 吴建伟, 2017. 家蝇 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂(*Serpin*)基因的克隆、序列分析及表达模式. 环境昆虫学报, 39(6): 1334 – 1341]

Yuan C, Xing L, Wang M, Wang X, Yin M, Wang Q, Hu Z, Zou Z, 2017. Inhibition of melanization by serpin-5 and serpin-9 promotes baculovirus infection in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *PLoS Pathog.*, 13(9): e1006645.

Zeng J, Wang GB, Wang DY, Zhou JL, Wang Y, Yang RS, Qin L, 2017. Cloning and functional analysis of serine protease inhibitor 6 encoding gene (*Apserpin*-6) from *Antheraea pernyi*. *Sci. Seric.*, 43(5): 764 – 772. [曾军, 王国宝, 王德意, 周敬林, 王勇, 杨瑞生, 秦利, 2017. 柞蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 6 基因 *Apserpin*-6 的克隆及功能分析. 蚕业科学, 43(5): 764 – 772]

Zhao LF, Tao ML, Pan GQ, 2016. Advances in serine protease inhibitors (Serpin) superfamily. *Sci. Seric.*, 42(3): 532 – 540. [赵丽芳, 陶美林, 潘国庆, 2016. 丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的研究进展. 蚕业科学, 42(3): 532 – 540]

Zhao P, Dong Z, Duan J, Wang G, Wang L, Li Y, Xiang Z, Xia Q, 2012. Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 7(2): e31168.

Zhang YX, 2014. Molecular Basis for Insecticide Induced Reproduction of Three Planthopper Species Brown Planthopper (BPH) *Nilaparvata lugens* Stål, White-backed Planthopper (WBPH) *Sogatella furcifera* Horvath and the Small Brown Planthopper (SBPH) *Laodelphax striatella* Fallén. MSc Thesis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu. [张艺馨, 2014. 农药刺激三种飞虱生殖情况及其分子机制的研究. 江苏扬州: 扬州大学硕士学位论文]

Zhao Y, 2018. The Functional Study on Serpin2 and βGRP3 in Immune Recognition and Defence Process of Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* Guenée. MSc Thesis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu. [赵雅, 2018. Serpin2 和 βGRP3 在亚洲玉米螟免疫识别和防卫过程中的功能研究. 江苏扬州: 扬州大学硕士学位论文]

Zhu XT, Liu JJ, Sun JJ, Li JG, 2017. Cloning and expression analysis of serine protease inhibitor encoding genes from *Helicoverpa armigera*. *Genomics Appl. Biol.*, 36(4): 1468 – 1476. [朱笑婷, 刘娟娟, 孙姣姣, 李继刚, 2017. 棉铃虫丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆及表达分析. 基因组学与应用生物学, 36(4): 1468 – 1476]

Zhu Y, Wang Y, Gorman MJ, Jiang H, Kanost MR, 2003. *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *J. Biol. Chem.*, 278(47): 46556 – 46564.

（责任编辑：马丽萍）